

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12P 7/18 // (C12P 7/18 C12R 1:01, 1:145)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/25696 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00568 (22) Date de dépôt international: 14 juin 1993 (14.06.93)		(74) Mandataire: MICHELET, Alain; Cabinet Harlé & Philip, 21, rue de La-Rocheoucauld, F-75009 Paris (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 92/07212 15 juin 1992 (15.06.92) FR		(81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMI- QUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): BORIES, André [FR/FR]; 5, rue du Rec, F-11110 Armissan (FR). CLA- RET, Carole [FR/FR]; 4, chemin de la Gloriette, F- 11110 Vinassan (FR).			
(54) Titre: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF PRODUCTS HAVING BACTERIAL ACTIVITY AND CAPABLE OF TRANSFORMING GLYCEROL INTO 1,3-PROPANEDIOL, CORRESPONDING STRAINS AND APPLICA- TION IN THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL			
(54) Titre: PROCEDE POUR L'OBTENTION DE PRODUITS A ACTIVITE BACTERIENNE, CAPABLES DE TRANS- FORMER LE GLYCEROL EN 1,3-PROPANEDIOL, SOUCHES CORRESPONDANTES ET APPLICATION A LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DE 1,3-PROPANEDIOL			
(57) Abstract			
Process for the production of products having bacterial activity and capable of converting glycerol into 1,3-propanediol. The invention consists in firstly producing bacterial strains or species which ferment glycerol from anaerobic microbial habitats present in nature and enriching by discontinuous fermentation said precultures. The products having bacterial activity are then isolated used to convert glycerol by fermentation into 1,3-propanediol. The invention is characterized in that the conversion results in high yield and in that the biosynthesis of 1,3-propanediol prevents the formation of a large number of by-products.			
(57) Abrégé			
Procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol. L'invention consiste à obtenir d'abord des souches ou espèces bactériennes fermentant le glycérol à partir d'habitats microbien anaérobies présents dans la nature. A partir des précultures actives, on réalise une étape d'enrichissement en fermentation discontinue, puis on isole les produits à activité bactérienne pour effectuer la conversion du glycérol par fermentation en 1,3-propanediol. Le rendement de la conversion est élevé et la biosynthèse du 1,3-propanediol évite la formation d'un nombre élevé de sous-produits.			
<p style="text-align: center;"><i>No English</i></p> <div style="border: 1px solid black; width: 100%; height: 40px; margin-top: 10px;"></div>			

BEST AVAILABLE COPY

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.**

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Géhon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	CR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Lichtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	'SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

5                   Procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol, souches correspondantes et application à la production industrielle de 1,3-propanediol.

10                  La présente invention concerne la production de 1,3-propanediol par fermentation de glycérol . Elle a plus particulièrement pour objet l'obtention de produits à activité bactérienne, capables de transformér le glycérol en 1,3- propanediol et leur application à la production industrielle de 1,3- propanediol . Les produits à activité bactérienne obtenus selon l'invention sont des populations microbiennes représentées par des écosystèmes anaérobies de digesteurs de résidus agro-industriels, de sédiments et de boues, ou de nouvelles souches pures issues de ces milieux . Parmi ces dernières , on peut notamment citer : Enterobacter agglomerans, biogroupe V et Clostridium butyricum .

20                  L'invention a encore pour objet la production industrielle de 1,3-propanediol à partir de glycérol de co-produits et résidus de transformation de matières d'origine végétale ou animale, et en particulier les co-produits de distillation d'alcool d'origine agricole (éthanol industriel ou bioéthanol, alcools de bouche et eaux de vie , et substances analogues).

25                  Le 1,3-propanediol ou triméthyléneglycol est un produit de base pour la synthèse des polyuréthanes et des polyesters , qui se substitue avantageusement aux matières premières actuellement utilisées, comme l'éthyléneglycol, le 1,2-propanediol et le 1,4-butane diol, grâce aux caractéristiques qu'il confère

aux produits obtenus: résistance des fibres , élasticité, résistance à la lumière, à la corrosion, ... Il s'utilise également comme additif dans la préparation de produits agro-alimentaires, et 5 pharmaceutiques ( agent humectant par exemple ) dans les aliments pour animaux, le tabac, les préparations pharmaceutiques ....

La synthèse chimique de 1,3-propanediol s'effectue à partir de l'acroléine, matière très toxique , et issue de sources fossiles . Elle nécessite plusieurs étapes : déshydratation en hydroxypropanal puis hydrogénéation catalytique, mettant en oeuvre des réactions délicates à réaliser et dont les principaux inconvénients sont les risques 15 dûs à l'acroléine et aux produits secondaires, les conditions strictes de synthèse , la contamination éventuelle du produit fini par des substances toxiques, ce qui réduit les usages du 1,3-propanediol.

La formation de 1,3-propanediol a été mise en 20 évidence ces dernières années chez quelques bactéries anaérobies facultatives et strictes, se développant à partir de glycérol comme substrat carboné . Mais le nombre de bactéries produisant du 1,3-propanediol et les connaissances sur les conditions de production 25 sont encore restreints. En effet, seulement trois genres principaux sont connus : Clostridium, Klebsiella, Citrobacter, choix réduit qui limite les possibilités d'amélioration de la production.

Les premiers travaux relatant la formation 30 microbienne de 1,3-propanediol ont été présentés par Magazanik et col., 1954 , (J. Bacteriol., 66, 611-619), chez Klebsiella pneumoniae , bactérie anaérobie facultative . La voie métabolique de biosynthèse du

1,3-propanediol a été ultérieurement caractérisée par Forage et Foster, 1982, ( J. Bacteriol., 149, 413-419 ) , et elle comprend deux étapes enzymatiques effectuées par une glycérol-déshydratase à coenzyme B12 dépendante et une 1,3-propanediol oxydoréductase à NAD . Le rendement de conversion du glycérol comme monosubstrat en 1,3- propanediol est chez cette bactérie d'environ 40-45 % ( poids/ poids) . Les autres produits formés par la bactérie à partir du glycérol sont : l'acétate, le lactate, l'éthanol, le 2,3- butanediol.

Dans le genre *Citrobacter*, une espèce a été décrite comme formant du 1,3-propanediol ; *Citrobacter freundii* (Homann et col., 1990, Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 121-126). Le rendement de conversion à partir de glycérol comme monosubstrat est proche de 50% ( poids/poids) , avec formation prépondérante d'acétate comme principal co-produit fermentaire, ainsi que des produits secondaires comme l'éthanol et le lactate . A la connaissance du demandeur , les seuls micro-organismes anaérobies stricts cités dans la littérature fermentant le glycérol en 1,3- propanediol appartiennent au genre *Clostridium* et les espèces sont : *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butylicum*, *C. butyricum*, *C. kantongtoui*.

Comme document illustrant l'état de la technique dans le domaine de l'invention, on peut également citer la demande de brevet EP-A-0 361.082 qui décrit un procédé de sélection de souches bactériennes disponibles, en particulier dans des collections de cultures, pour leur aptitude à transformer le glycérol en 1,3-propanediol. Selon ce procédé, on réalise une fermentation dans des

conditions habituelles, en présence d'une des souches à sélectionner, d'une solution de glycérine à 5% comme seule source de carbone. On sélectionne les souches qui procurent le meilleur rendement de transformation  
5 en 1,3- propanediol.

On connaît aussi un procédé de sélection de souches à partir d'échantillons de paille en décomposition et de compost . Néanmoins ce procédé décrit par Biebl et al. (1991, Appl. Microb. Biol.,  
10 36, n°5, 592-597) présente l'inconvénient notable de nécessiter une pasteurisation des échantillons avant leur mise en culture . Seuls les microorganismes sporulés survivent à cette opération tandis que de nombreux genres , tels que Citrobacter et Klebsiella,  
15 sont détruits .

20 Ce procédé élimine ainsi avant l'étape de sélection des micro-organismes pouvant présenter des caractéristiques intéressantes . Il est donc très spécifique et ne permet la sélection que dans une gamme restreinte de micro-organismes.

25 On notera de plus que ce document ne mentionne l'isolement de souches qu'à partir d'habitats , tels que de la paille en décomposition ou du compost, où les organismes sont en présence d'air et non à partir d'habitats anaérobies.

A partir de glycérol comme seul substrat carboné, la voie fermentaire chez Clostridium conduit respectivement à :

30 - la synthèse de 1,3-propanediol , voie assurant la régénération des coenzymes réduits (NADH),  
- la formation de métabolites : butyrate, acétate, éthanol, butanol, acétone, dioxyde de carbone

et hydrogène , en proportion variable selon les espèces et les conditions, mais qui résultent directement ou indirectement des voies obligées de production d'énergie (ATP) générant également les coenzymes réduits . Les tentatives d'apport de co-substrats carbonés, tels les oses, pour favoriser les voies de production d'énergie et orienter préférentiellement la synthèse du 1,3-propanediol à partir de glycérol, conduisent à l'accumulation de ces produits secondaires, facteurs potentiels d'inhibition des bactéries ( Biebl M., 1991, Appl. Microb. Biol., 35, 701-705).

Les conditions de mise en oeuvre de ces souches bactériennes, en cultures pures anaérobies, constituent des handicaps à l'échelle de la production de 1,3-propanediol en condition industrielle . Il est en effet indispensable d'opérer dans des conditions de stérilité pour éviter les contaminations, d'acclimater les souches aux milieux de production et d'adapter les compositions et paramètres des milieux . En outre , les produits de réaction sont sensibles aux inhibiteurs du milieu fermentaire, initialement présents ou formés.

L'invention concerne l'obtention de bactéries anaérobies facultatives et strictes fermentant le glycérol et la production de 1,3-propanediol par des espèces et des souches nouvellement décrites et obtenues, en cultures pures ou mixtes . Ce procédé est destiné à la production de 1,3- propanediol principalement à partir du glycérol contenu dans des substances issues de procédés industriels de transformation de matières d'origines végétales , ou de milieux à base de glycérol purifié.

Jusqu'à présent , à la connaissance du demandeur , aucun procédé de production de 1,3 propanediol n'a fait référence à des méthodes d'obtention, d'isolement et d'utilisation des souches microbiennes à partir d'habitats microbiens anaérobies. Le nombre restreint de souches de collection productrices de 1,3 propanediol entraîne des difficultés d'acclimatation des souches à des milieux aussi variés que ceux d'origine industrielle.

Sous un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3- propanediol, ledit procédé comprenant les étapes de (a) préculture de populations anaérobies, issues d'habitats microbiens anaérobies, ladite préculture étant réalisée dans des conditions anaérobies sur milieu nutritif tamponné , contenant du glycérol comme seule source de carbone , (b) isolement des précultures microbiennes actives capables de fermenter le glycérol (c) enrichissement par fermentation discontinue desdites précultures dans un réacteur anaérobie , sur milieu nutritif à base de glycérol comme substrat et à pH régulé (d) isolement des produits à activité bactérienne capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol.

L'invention part de l'observation selon laquelle la fermentation du glycérol en 1,3- propanediol est une étape préalable principale de la dégradation qui prend place dans des écosystèmes anaérobies.

La présente invention consiste à obtenir des produits à activité bactérienne , et en particulier des souches pures bactériennes, fermentant le glycérol

à partir d'habitats microbiens anaérobies représentés par exemple par des digesteurs anaérobies, des sédiments de milieux naturels (sols, et autres) et de boues de bassin de stockage d'effluents.

5 Selon l'invention, des précultures de populations anaérobies issues d'habitats microbiens anaérobies sont réalisées en conditions anaérobies sur milieu nutritif tamponné, à base de glycérol comme seule source de carbone et d'énergie, dans le but de favoriser le développement des souches capables de fermenter le glycérol. A partir des précultures actives, une phase d'enrichissement est effectuée en fermentation discontinue (batch) en réacteur anaérobiose, sur milieu nutritif à base de glycérol comme substrat, et à pH régulé.

10 15 Les conditions pratiques de pH varient selon la nature des microorganismes isolés. Des pH compris entre 5 et 8, et de préférence entre 6 et 7,5 se sont avérés les plus appropriés.

20 25 Durant la phase de consommation du glycérol par la culture enrichie en microorganismes fermentant le glycérol, l'isolement de souches bactériennes est opéré à partir de prélèvements en anaérobiose, et mettant en oeuvre une méthode de dilution des populations puis un étalement sur boîtes de Pétri selon une technique de simple ou double couche de milieu de culture gélosé, permettant de respecter les conditions anaérobies adaptées aux germes anaérobies facultatifs ou stricts.

30 La présente invention concerne les produits et bactéries ainsi obtenus, à partir de sources microbiennes anaérobies capables de produire du 1,3 propanediol, et qui appartiennent en particulier aux

espèces suivantes : Enterobacter agglomerans,  
Clostridium butyricum, Citrobacter amalonaticus.

Sous un autre aspect, l'invention concerne également de nouvelles souches bactériennes identifiées par leur numéro de dépôt auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur ( CNCM), 25, rue du Docteur Roux , PARIS, à savoir :

10 - la souche Enterobacter agglomerans, biogroupe V (souche PPDAF- INRA) , déposée sous le N° I-1210 le 20 Mai 1992,

- la souche Clostridium butyricum ( souche PPDAS- INRA), déposée sous le n° I-1211 le 20 Mai 1992,

15 - la souche Citrobacter amalonaticus ( souche GAF-INRA) déposée sous le n° I-1212 le 20 Mai 1992.

Sous encore un autre aspect de l'invention , le procédé de production de 1,3-propanediol comprend la mise en oeuvre des produits à activité bactérienne, que ce soit en cultures pures - en particulier des bactéries Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum - , ou en cultures mixtes d'écosystèmes anaérobies qui contiennent au moins une des espèces ou souches des bactéries : Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum, Citrobacter amalonaticus.

Le procédé selon l'invention peut utiliser l'espèce bactérienne Enterobacter agglomerans et plus particulièrement la nouvelle souche Enterobacter agglomerans pour la production de 1,3-propanediol à partir de glycérol comme seule source de carbone assimilé, espèce nouvellement décrite pour sa capacité à fermenter le glycérol en 1,3-propanediol. La mise en oeuvre des souches Enterobacter agglomerans est

réalisée en conditions d'anaérobiose sur milieu de culture contenant du cobalt et en particulier sur milieu minéral additionné de 0,45 mg/l de cobalt et avec contrôle et régulation du pH entre 6 et 7,5 et de préférence à pH 7, dans une gamme de température située entre 28 et 40°C environ.

La nouvelle souche Enterobacter agglomerans se caractérise par un rendement de production de 1,3-propanediol d'au moins 74 mM pour 100 mM de glycérol consommé et une productivité volumique d'au moins 2 g de propanediol par litre et par heure en phase active de fermentation (glycérol à 2%). L'analyse du profil fermentaire révèle que la biosynthèse de 1,3-propanediol s'accompagne de la formation exclusive d'acide acétique comme co-métabolite majeur dosé dans la phase aqueuse, ce qui constitue un moyen de simplifier la phase de purification. La souche montre de plus un caractère gazogène peu élevé à partir de glycérol.

L'ensemble des caractéristiques relatives aux conditions et performances fermentaires du glycérol en 1,3-propanediol décrites ci-dessus : rendement très élevé, forte productivité, acétate comme seul co-produit accumulé, confèrent au procédé selon l'invention mettant en oeuvre l'espèce Enterobacter agglomerans et plus particulièrement la nouvelle souche Enterobacter agglomerans, des meilleures possibilités d'utilisation pour la production de propanediol à partir de glycérol comme source de carbone assimilable, en vue de l'application industrielle à des solutions de glycérol purifié ou contenu dans les eaux de procédés de transformation de matières organiques renouvelables.

Dans le procédé selon l'invention on peut également utiliser la nouvelle souche Clostridium butyricum, pour la production de propanediol à partir de glycérol présent dans des sous-produits d'origine agro-industrielle ou à partir de glycérol purifié, 5 selon les conditions de fermentation suivantes :

- anaérobiose stricte - purge du milieu par flux d'azote, ajout de composés réducteurs ,
- 10 - pH régulé à des valeurs comprises entre 5 et 8 et de préférence entre 6 et 7,5,
- température : située entre 32 et 40°C, environ, notamment voisine de 37°C.

Le milieu de fermentation contient des éléments minéraux cofacteurs de l'extrait de levure et du 15 glycérol à des concentrations comprises entre 15 et 200 g/l.

Il peut contenir en outre d'autres substances organiques soit non assimilées, soit capables d'être utilisées en tant que co-substrat.

20 Les rendements de conversion du glycérol en 1,3-propanediol obtenus sur milieu d'origine industrielle sont semblables à ceux déterminés en milieu synthétique : 64 % et 57% respectivement ( rendement molaire ).

25 Dans les conditions conformes à l'invention, la production de propanediol à partir de glycérol comme seul substrat carboné par Clostridium butyricum est réalisée pour une concentration initiale en glycérol allant jusqu'à 200 g/l, de préférence entre 65 et 180 30 g/l, avec une productivité volumique comprise entre 4,5 et 2,3 g de propanediol par litre de fermenteur et par heure , durant la phase active de fermentation.

Alors que les souches du genre Clostridium

fermentant le glycérol en 1,3-propanediol répertoriées dans la bibliographie produisent un grand nombre de sous-produits : acétate, butyrate, éthanol, lactate, ..., le procédé selon l'invention conduit à la formation d'un seul co-métabolite majeur, l'acide butyrique pouvant faciliter les opérations ultérieures de récupération du 1,3-propanediol.

Le procédé faisant l'objet de la présente invention peut mettre en oeuvre toute population microbienne anaérobiose d'origine naturelle ou industrielle dans laquelle la présence de l'espèce Enterobacter agglomerans ou de Clostridium butyricum est démontrée.

Ce procédé de production de propanediol à partir des populations mixtes ainsi définies, permet une simplification de la mise en oeuvre des fermentations par diminution du risque de contamination.

La production de 1,3-propanediol est effectuée à pH compris entre 5 et 8, et de préférence entre 6,5 et 7, pour une concentration en glycérol comprise entre 20 et 125 g/l. A 37 °C, et à pH 6,5, le rendement optimal de conversion du glycérol en propanediol est de 66,7 %, lorsque la fermentation est réalisée avec 2% de glycérol. La plus forte productivité obtenue pour une culture à 50 g/l de glycérol est de 2,4 g/l/hr.

L'invention sera encore illustrée sans être aucunement limitée par les exemples qui suivent :

EXEMPLE 1:

Obtention et isolement de souches bactériennes à partir de flores microbiennes anaérobies fermentant le glycérol en 1,3-propanediol.

A partir d'une flore microbienne prélevée dans des habitats anaérobies tels les digesteurs anaérobies d'effluents de distilleries, d'agro-industries, ainsi que des milieux anaérobies comme des sédiments et des 5 boues de sites récepteurs d'effluents, l'obtention des souches pures bactériennes fermentant le glycérol est réalisée selon le protocole suivant.

Une fiole type pénicilline, contenant 120 ml de milieu minéral tamponné et du glycérol ( 20 g/l ), 10 est inoculée par 10 ml de la suspension bactérienne et incubée selon les conditions citées à l'exemple 3. En phase fermentaire du glycérol, contrôlée par analyse en HPLC, 90 ml de la suspension sont prélevés pour inoculer un réacteur anaérobie, contenant 0,9 l de 15 milieu de culture décrit ci-dessus. Durant la phase de production de propanediol observée par analyse HPLC, 1 ml de culture microbienne anaérobie du réacteur est prélevé en condition aseptique et anaérobie ( seringue purgée à l'azote ) pour inoculer 20 un tube à bouchon à vis muni d'un septum, contenant 9 ml d'eau physiologique anaérobie stérile.

A partir du tube, des dilutions successives d'un facteur 10 sont réalisées de tube en tube. Pour 25 chaque tube de dilution de  $10^3$  à  $10^6$ , deux boîtes de Pétri sont préparées: milieu brewer's ( Merck) en simple couche et milieu brewer's en double couche pour isolement des microorganismes anaérobies stricts. L'incubation se déroule en jarre anaérobie, purgée à l'azote, et maintenu sous anaérobiose par un dispositif " Anaerocult " de la Société Merck à 37°C. 30 Après 48 h, les colonies sont prélevées et inoculées en tube de milieu glycérol (A) pour examen et identification après 24 h de culture selon les

critères et méthodes de microbiologie préconisés pour les microorganismes anaérobies stricts et facultatifs.

Selon cette méthode trois souches :

- *Enterobacter agglomerans*, bactérgroupe V
- *Clostridium butyricum*
- *Citrobacter amalonaticus*

5 sont obtenues à partir des sources microbiennes suivantes : boues de digesteur anaérobie, boues et sédiments de milieux naturels ( sols, lagunes, 10 étangs), à partir desquelles la production de 1,3-propanediol est observée.

15 Les deux souches : *Enterobacter agglomerans* et *Citrobacter amalonaticus*, appartiennent à des espèces bactériennes , non connues dans la littérature scientifique pour la fermentation du glycérol . La nouvelle souche de *C. butyricum* obtenue est différente des souches connues de l'espèce par les profils fermentaires ( voir exemple 3).

EXEMPLE 2:

20 Production de 1,3-propanediol à partir de glycérol par *Enterobacter agglomerans*.

25 Le milieu nutritif utilisé pour la croissance et la production de 1,3-propanediol par *Enterobacter agglomerans* est un milieu minéral enrichi en extrait de levure et en sel de cobalt, contenant du glycérol comme seule source de carbone et d'énergie .

Composition du milieu de culture

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O	10,7 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4 g
5	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
	COCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1,8 mg
	Extrait de levure	1 g
	Solution minérale	1 ml
10	Glycérol	20 g
	H <sub>2</sub> O distillée qsp	1 l

Solution minérale

	EDTA	5 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,124 g
15	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,03 g
	COCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,02 g
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2 g
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
	NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,03 g
20	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,02 g
	Solution minérale ( suite)	
	CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,01 g
	H <sub>2</sub> O distillée qsp	1 l

Le milieu est porté à ébullition puis refroidi sous azote . Après autoclavage, il est réduit par ajout d'une solution de L-cystéine à 20 gl<sup>-1</sup> ( 0,5 % vol/vol).

La pré-culture ( 90 ml) inoculée à partir de tubes de conservation ( 10 ml) est réalisée en flacons pénicilline anaérobies, à 37°C. Après 36 h d'incubation, l'inoculum activé est transféré dans un réacteur anaérobie de 1 l précédemment décrit, contenant 904,5 ml de milieu réduit à 2 % de glycérol

et purgé à l'azote gazeux.

La fermentation se déroule à 37°C , à pH régulé à 7.

Le glycérol est exclusivement converti par Enterobacter agglomerans en 1,3-propanediol et acétate en tant que métabolites hydrocarbonés avec des rendements molaires respectifs de 74 mM de PPD et de 24 mM d'acétate formés à partir de 100 mM de glycérol consommé . Les résultats sont rassemblés à la figure 1 qui est un diagramme illustrant le profil de conversion du glycérol par Enterobacter agglomerans, dans lequel on a porté, en abscisses, la durée de conversion exprimée en heures et en ordonnées, respectivement sur l'axe de gauche la quantité de biomasse exprimée en g/l et sur l'axe de droite les quantités de glycérol et de produits formés (1,3-propanediol et acétate) , exprimées en mM.

La productivité volumique maximale en 1,3-propanediol est de 1,98 g de PPD/l/h, ce qui se traduit par une durée de fermentation de 12 heures.

EXEMPLE 3:

Production de 1,3-propanediol par Clostridium butyricum.

Clostridium butyricum est mis en culture pendant 24 heures sur milieu minéral fortement tamponné à base de glycérol dont la composition est décrite ci-dessous. L'incubation se déroule dans des flacons de type pénicilline, hermétiquement clos, de 120 ml , en conditions anaérobies strictes (atmosphère d'azote, ajout de composés réducteurs dans le milieu après autoclavage ) à 37°C . Le taux d'ensemencement est de 10% vol/vol.

Ces précultures sont ensuite utilisées pour

inoculer des fermenteurs de 1 l ( ajout de 90 ml de pré-culture dans 900 ml de milieu nutritif stérile ), maintenus en conditions anaérobies ( utilisation d'azote en phase gazeuse ) et munis de systèmes de régulation du pH ( ajout contrôlé de soude 2N ) et de température ( circulation d'eau thermostatée ).

L'homogénéisation est assurée par agitation magnétique et un piège à oxygène à pyrogallol, placé à l'interface réacteur-atmosphère, permet d'éviter les entrées d'oxygène dans le réacteur .

Les fermentations ont lieu à 37°C , à pH contrôlé à 6,5 sur milieu salin contenant 10 % vol/vol de glycérol.

15 TABLEAU I  
Composition des milieux de culture

	(A) milieu tamponné (fiole)	(B) milieu pour réacteur pH régulé	
20	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> CaCO <sub>3</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O Extrait de levure Glycérol	3,4 g 1,3 g 2 g 2 g 0,2 g 20 mg 5 mg 1 g 20 g	1g 0,5g 0 2g 0,2g 20mg 5mg 1g
25	H <sub>2</sub> O distillée	qsp 1000 ml	20 à 200g QSP 1000 ml
30			

Le milieu tamponné (A) est porté à ébullition, réparti dans des fioles hermétiquement bouchées (bouchon butyl et capsule métallique) et refroidi sous azote avant autoclavage.

35 Les réacteurs, après autoclavage, sont refroidis sous flux d'azote pour éviter la dissolution d'oxygène dans le milieu. Les solutions réductrices et

vitaminiques ci-après sont ensuite ajoutées ( à 2% et 4% volume/volume respectivement ) dans ces milieux.

Solution réductrice

5        6,25 g de L-cystéine et 6,25 g de Na<sub>2</sub>S, 9H<sub>2</sub>O sont dissous dans 500 ml d'une solution de soude 0,8 N préalablement désoxygénée.

Solution vitaminique

	Biotine	5 mg
10	Acide para-amino-benzoïque	2 g
	Cobalamide	15 mg
	H <sub>2</sub> O distillée qsp	100 ml

15       Le profil de fermentation est présenté à la figure 2 qui est un diagramme analogue à la figure 1, établi pour illustrer le profil de conversion du glycérol par Clostridium butyricum, les produits formés étant dans ce cas le 1,3-propanediol et le butyrate. Le rendement de la culture pure de Clostridium butyricum ( souche I-1211) est de 57 mM de 1,3-propanediol formé par 100 mM glycérol consommé. Le butyrate est le seul co-produit hydrocarboné détecté en phase aqueuse et représente moins de 7% de la quantité molaire de glycérol consommé .

20       Lorsque la fermentation débute avec 65 g glycérol/l, la productivité maximale de conversion en 1,3-propanediol est de 4,5 g/l/hr et la durée de fermentation est de 22 heures.

EXEMPLE 4:

25       Production de 1,3-propanediol par Clostridium butyricum à partir de résidus industriels d'origine agricole et alimentaire contenant du glycérol.

30       Le microorganisme est pré-cultivé en conditions d'anaérobiose stricte, à 37°C en fioles pénicilline, sur milieu minéral fortement tamponné (A) décrit dans

l'exemple 3, pendant 24 heures . Ces précultures sont ensuite utilisées pour inoculer un milieu d'origine industrielle dans lequel le glycérol est le composé organique majeur, représenté par des effluents de distillation d'alcool d'origine agricole.

Pour les fermentations présentées ci-après, les co-produits disponibles industriellement sont préparés selon le protocole suivant : ajustement de la teneur en glycérol entre 14 et 15,8 g/l par dilution du milieu et addition de facteurs nutritifs et salins ( $K_2HPO_4$ : 1  $g l^{-1}$ ;  $K_2HPO_4$ : 0,5  $g l^{-1}$ ;  $(NH_4)_2SO_4$ : 2  $g l^{-1}$ ;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ : 0,2  $g l^{-1}$ ;  $COCl_2 \cdot 2H_2O$ : 20  $mg l^{-1}$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ : 5  $mg l^{-1}$ ; 1  $g l^{-1}$  d'extrait de levure ).

Les réacteurs anaérobies contenant 0,9 l de milieu sont autoclavés et refroidis sous azote et réduits par addition de la solution réductrice citée à l'exemple 1.

L'inoculation est effectuée par 90 ml de suspension bactérienne , et la fermentation est conduite à pH 6,5 avec régulation et à 37°C.

TABLEAU II

Caractéristiques de la conversion de glycérol  
d'origine naturelle par *Clostridium butyricum* ( souche  
I-1211)

	Origine du substrat	Eau résiduaire de distillerie n°1 (vinasse de vin rouge)	Eau résiduaire de distillerie n°2 (vinasse de vin blanc)
5			
10	concentration initiale en glycérol	15,8 g/l	14g/l
15	production de 1,3-propanediol	8,4 g/l	6,6 g/l
	rendement molaire mole de PPD produit/mole de glycérol consommé	0,64	0,57

EXEMPLE 5:

Production de 1,3-propanediol par une population microbienne de digesteur anaérobie d'eaux résiduaires de distilleries de bio-éthanol, contenant les souches *Clostridium butyricum* ( souche I-1211) ou *Enterobacter agglomerans* ( souche I-1210).

La flore microbienne mixte anaérobie a été mise en culture selon le protocole de préparation des fermentations décrit dans l'exemple 3.

Le milieu de fermentation en réacteur anaérobie comprend du glycérol à concentration variable : entre 20 et 125 % ( poids/volume); les cultures se déroulent à pH compris entre 5 et 8, et à 37°C.

Les figures 3a et 3b montrent le profil de conversion du glycérol par la flore anaérobie de digesteur qui est une flore microbienne anaérobie

mixte.

La figure 3a est un diagramme analogue aux figures 1 et 2 avec en ordonnées, à droite, les quantités en mM de glycérol et de 1,3-propanediol formés , tandis qu'à la figure 3b l'axe des ordonnées à gauche montre les quantités en mM de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) formées et à droite , les quantités en mM de produits (1,3-propanediol et butyrate ) formés. Le 1,3-propanediol est le principal produit formé par fermentation du glycérol par la population microbienne anaérobie , avec un taux de conversion très élevé : 66,7 mM de 1,3-propanediol formé à partir de 100 mM de glycérol consommé . La vitesse maximale de production de 1,3-propanediol ( productivité volumique ) est de 2,3 g/l/hr, et pour une durée de fermentation de 11 heures . Le propanediol formé n'est pas consommé et s'accumule au cours de la fermentation . L'acétate et le butyrate sont formés dans des proportions molaires équivalentes pendant la phase de production de 1,3-propanediol, représentant respectivement 7,4 et 6,6 % (mM) du glycérol consommé . Le  $\text{CO}_2$  et l'hydrogène sont les produits gazeux formés .

Les effets des conditions de pH et de la teneur en glycérol ont été illustrés aux figures 4 et 5, respectivement.

La figure 4 montre l'effet du pH sur le rendement molaire de production de 1,3-propanediol par la flore microbienne anaérobie mixte définie à l'exemple 5.

Il s'agit d'un diagramme dans lequel on a porté le pH en abscisses et , en ordonnées, le rendement molaire en 1,3-propanediol, exprimé en %.

La figure 5 montre l'effet de la concentration

en glycérol sur la vitesse maximale de production de 1,3-propanediol pour la même flore microbienne anaérobie mixte . Il s'agit d'un diagramme dans lequel on a porté en abscisses la quantité de glycérol exprimée en g/l et en ordonnées la productivité, exprimée en g/l/h, de 1,3-propanediol formé.

D'un point de vue rendement de conversion du glycérol en 1,3-propanediol, le pH le plus favorable est compris entre 6,5 et 7; rendement de 66,7 % ( mM propanediol formé pour 100 mM de glycérol consommé ) . Mais la production de propanediol s'effectue à pH 7,5 et jusqu'à pH 5, où le rendement est encore supérieur à 50%. Au niveau cinétique, la plus forte productivité est obtenue à pH 6,5 et pour une concentration initiale en glycérol de 50 g/l : 2,4 g 1,3-propanediol formé par litre et par heure.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne , capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol , ledit procédé comprenant  
5 les étapes de :
  - a) préculture de populations anaérobies , issues d'habitats microbiens anaérobies , ladite préculture étant réalisée dans des conditions anaérobies sur milieu nutritif tamponné contenant du glycérol comme seule source de carbone,
  - 10 b) isolement des précultures microbiennes actives capables de fermenter le glycérol;
  - c) enrichissement par fermentation discontinue desdites précultures dans un réacteur anaérobie , sur milieu nutritif à base de glycérol comme substrat et à pH régulé ;
  - d) isolement des produits à activité bactérienne capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol.
- 20 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'à titre d'habitats microbiens anaérobies , on utilise des digesteurs anaérobies , par exemple d'effluents de distillerie, d'agro-industrie ou bien des milieux anaérobies tels que des sédiments et des boues de sites récepteurs d'effluents.
- 25 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on règle le pH à une valeur comprise entre 5 et 8, et de préférence entre 6 et 7,5.
- 30 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'isolement des souches bactériennes est opéré à

partir de prélèvements en anaérobiose, avec dilution des populations puis étalement sur boîtes de Pétri sur milieux de cultures gélosés, dans des conditions anaérobies.

5. Produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol, susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

6. Produits selon la revendication 5, comprenant des bactéries Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum et Citrobacter amalonaticus, sous forme de cultures mixtes d'écosystèmes anaérobies.

7. Produits selon l'une des revendications 5 ou 6 consistant en des bactéries appartenant à l'espèce Enterobacter agglomerans.

8. Souche Enterobacter agglomerans, inscrite à la CNCM sous le n° I-1210.

9. Souche de Clostridium butyricum inscrite à la CNCM sous le n° I-1211.

10. Souche de Citrobacter amalonaticus, inscrite à la CNCM sous le n° I-1212.

11. Application des produits, espèces et souches à activité bactérienne selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, en vue de la conversion du glycérol par fermentation en 1,3-propanediol.

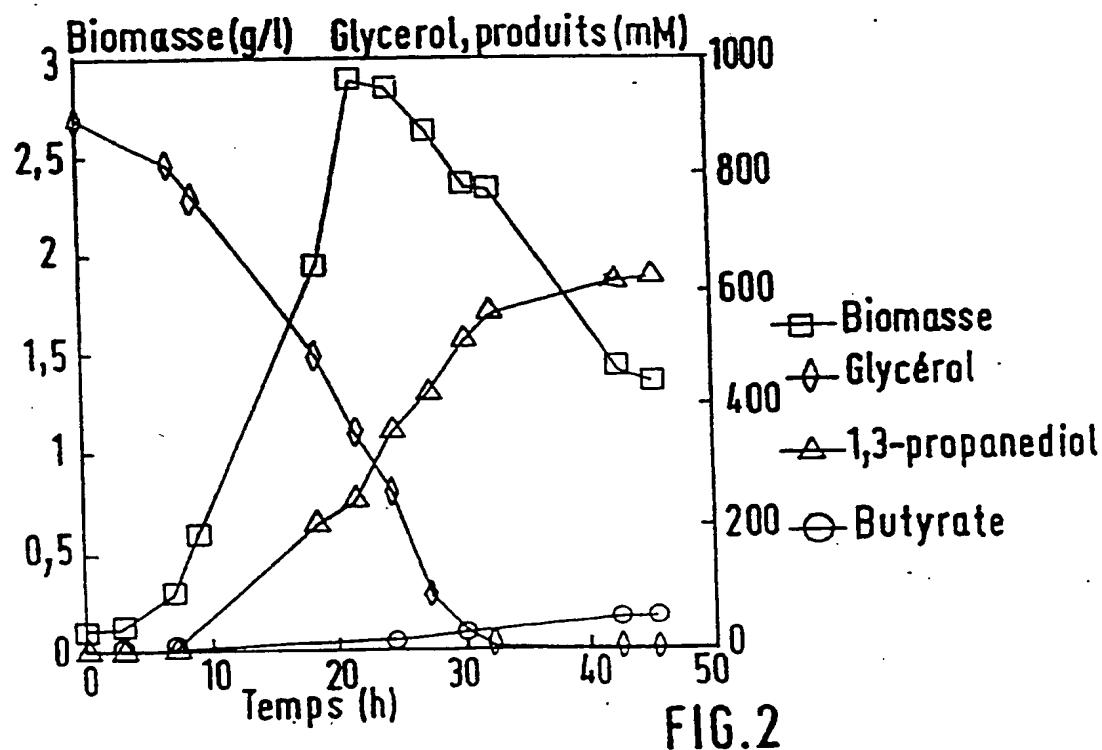
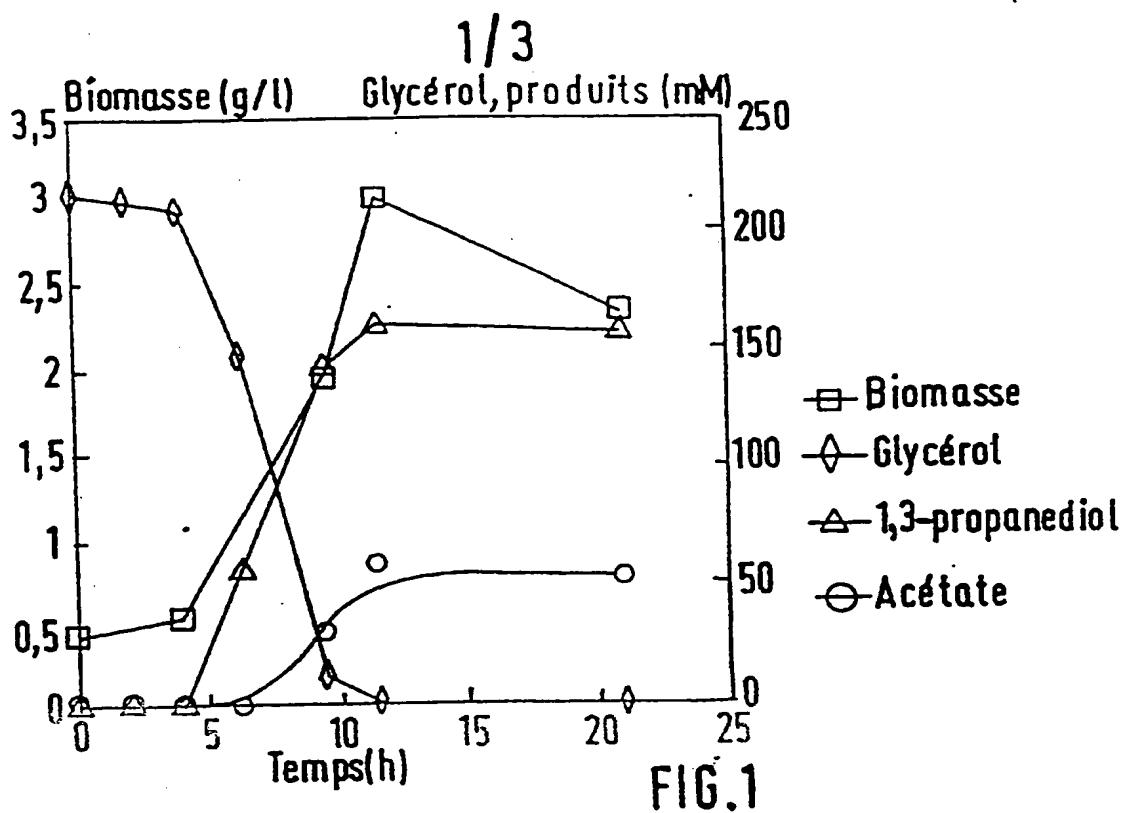
12. Application selon la revendication 11, selon laquelle on utilise l'espèce Enterobacter agglomerans, en particulier la souche Enterobacter agglomerans I-1210, la conversion du glycérol en 1,3-propanediol étant réalisée en condition d'anaérobiose avec contrôle et régulation du pH entre 6 et 7,5 et de préférence à pH 7, dans une gamme de température

située entre 28 et 40°C environ.

13. Application selon la revendication 11, dans laquelle on utilise la souche Clostridium butyricum I-1211, la conversion du glycérol en 1,3-propanediol étant réalisée en anaérobiose, avec pH régulé entre 5 et 8, et de préférence entre 6 et 7,5, et à une température située entre 32 et 40°C.

14. Application selon la revendication 11, dans laquelle on utilise une flore microbienne anaérobiose mixte, en particulier une population microbiennne contenant les espèces Enterobacter agglomerans et Clostridium butyricum et/ou les souches Clostridium butyricum I-1211 et Enterobacter agglomerans I-1210.

15. Application de produits à activité bactérienne selon la revendication 5, consistant en des populations bactériennes mixtes fermentant le glycérol et produisant du 1,3-propanediol, lesdites populations contenant notamment la souche Citrobacter amalonaticus I-1212 selon la revendication 10.



FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/3

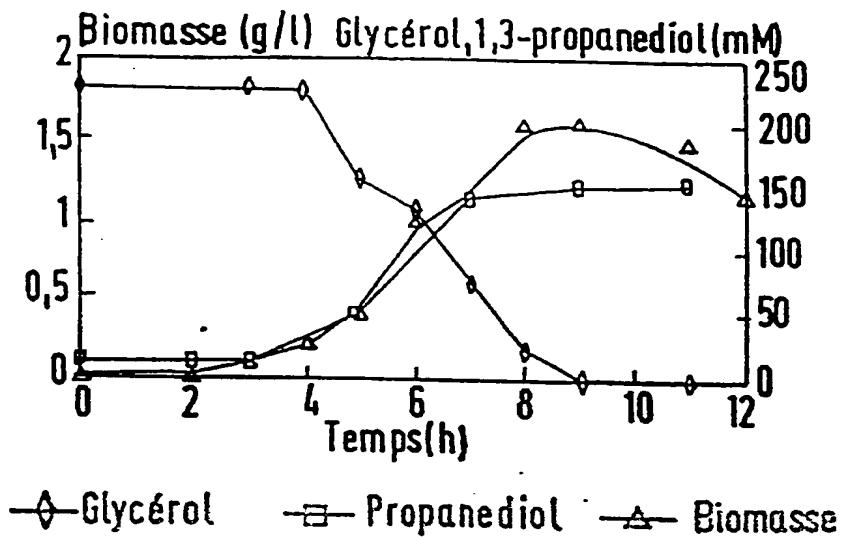


FIG.3a

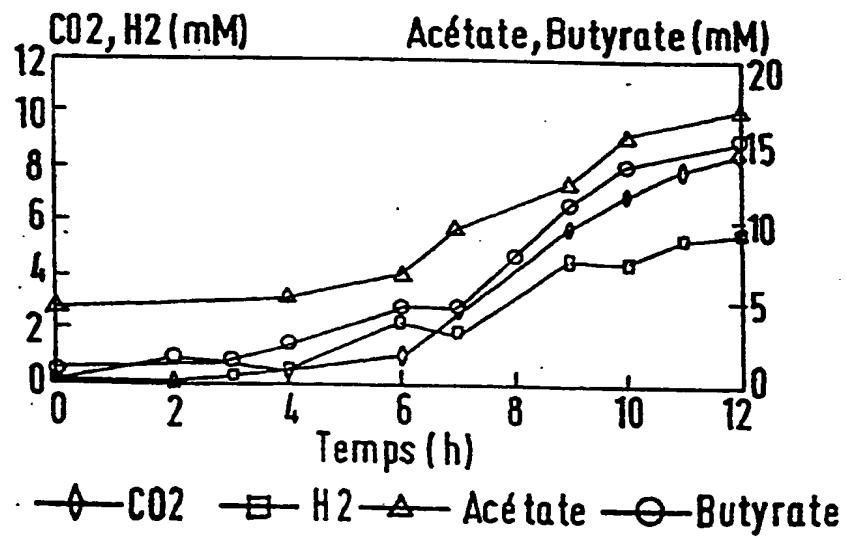


FIG.3b

FEUILLE DE REMplacement

3 / 3

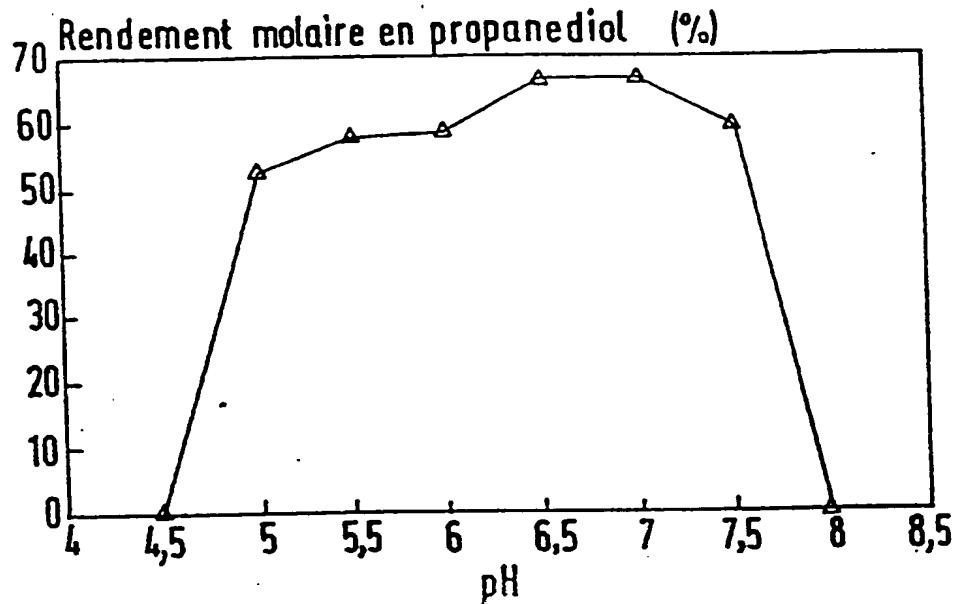


FIG.4

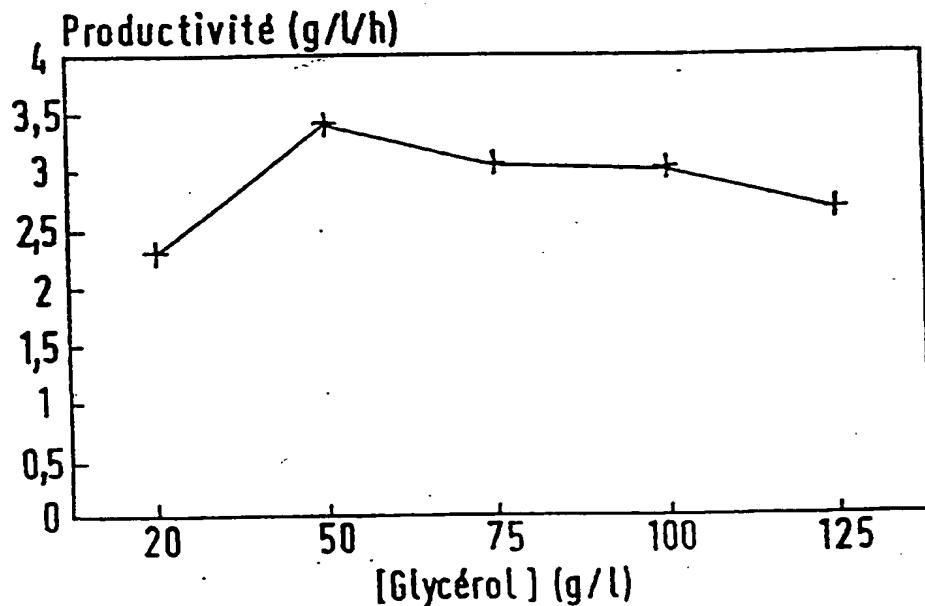


FIG.5

FEUILLE DE REMplacement

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00568

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC<sup>5</sup> : C12P 7/18; // (C12P 7/18, C12R 1:01, C12R 1:145)  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>5</sup> : C12P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<b>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY.</b> Vol. 36, No. 5, February 1992, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 592 - 597 H. BIEBL ET AL. "Glycerol conversion to 1, 3-propanediol by newly isolated clostridia." see abstract see page 593, column 1, paragraph 4 see page 596, column 1, last paragraph - page 597, column 1, last paragraph --- <b>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY.</b> Vol. 36, No. 3, December 1991, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 289 - 294 B. GUNZEL ET AL. "Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum up to a scale of 2m3." See the whole document --- ./. .	1-3
A		1,9

<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 1993 (20.08.93)	14 September 1993 (14.09.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

-2-

International application No.

PCT/FR93/00568

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A, 0361082 (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN) 4 April 1990 (cited in the application)	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>*</sup>	Identification des documents cités <sup>15</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 36, no. 3, Décembre 1991, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 289 - 294 B.GÜNZEL ET AL. 'Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum up to a scale of 2m3.' voir le document en entier ----	1,9
A	EP,A,0 361 082 (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN) 4 Avril 1990 cité dans la demande -----	

# BEST AVAILABLE COPY

## ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.

FR 9300568  
SA 75451

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Cesdits membres sont contenues au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

20/08/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0361082	04-04-90	DE-A- 3829618 DE-A- 3924423 JP-A- 3065192	15-03-90 31-01-91 20-03-91

EPO FORM P002

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**